

胡 亮,龙石太,吴宪红,等. 川中黑山羊 *OPN* 基因 cDNA 克隆及生物信息学分析[J]. 江苏农业科学,2014,42(5):34-36.

川中黑山羊 *OPN* 基因 cDNA 克隆及生物信息学分析

胡 亮,龙石太,吴宪红,王 永,字向东

(西南民族大学生命科学与技术学院,四川成都 610041)

摘要:以川中黑山羊为研究对象,对 *OPN* 基因 CDS 区进行克隆测序及生物信息学分析,并与 GenBank 其他物种该基因进行序列比对,结果表明,川中黑山 *OPN* 基因全长 952 bp,包含 1 个 834 bp 的完整的 CDS 编码区,编码 278 个氨基酸;*OPN* 的 CDS 编码区核苷酸序列与绵羊、牛、猪、人、马、小鼠、鸡相应序列的同源性分别为 98%、95%、79%、79%、70%、47%。

关键词:川中黑山羊;*OPN* 基因;克隆;生物信息学

中图分类号:S827.3 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2014)05-0034-02

山羊繁殖性能是山羊育种的重要指标,提高山羊窝产仔数对我国养羊业的可持续发展具有十分重要的意义。骨桥蛋白(osteopontin, *OPN*)是一种含精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(RGD)序列的分泌型糖基化磷蛋白,能够介导骨组织细胞与骨基质的连接,属于细胞外基质蛋白^[1]。*OPN* 广泛存在于乳汁、子宫、胎盘中,具有多种生物学活性。*OPN* 对雌性哺乳动物的繁殖过程有重要影响^[2]。Fernandez 等研究发现,骨桥蛋白对配子受精、受精卵卵裂、胚胎发育具有一定的刺激作用^[3]。王振金等发现,*OPN* 基因突变位点 *E34I* 与奶山羊的生长发育性状有显著的关联效应^[4]。*OPN* 基因与猪排卵率、子宫长度密切相关。有研究发现,在梅山猪、大白猪、长白猪合成系的 *OPN* 位点存在 13 个等位基因,其中有 5 个等位基因与产仔数显著相关。张淑君等研究发现,*OPN* 基因的标记位点与二花脸猪产仔数显著相关^[5]。大河乌猪 *OPN* 基因存在 8 个基因型,且初产活仔数与二产活仔数在各基因型之间差异显著^[6]。*OPN* 基因对大长杂交一代母猪产仔数也有显著影响^[7]。因此,开展 *OPN* 基因研究对于提高雌性动物繁殖性能、加快良种选育、更合理有效地开发利用品种资源具有重要意义。本试验以川中黑山羊为研究对象,对 *OPN* 基因 CDS 区进行克隆测序及生物信息学分析,并与 GenBank 其他物种该基因进行序列比对,在此基础上构建物种间分子系统进化树,旨在为川中黑山羊 *OPN* 基因的定位、表达调控研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

在四川省乐至县天龙科技示范园采集 1 只成年川中黑山羊的卵巢,液氮冻存储备用。动物组织总 RNA 提取试剂盒、2 × *Taq* PCR MasterMix、感受态细胞均购自上海天根生物科技有限公司;反转录试剂盒购自 Fermentas (MBI) 公司;

X-Gal、IPTG、氨苄青霉素、克隆载体 pMD-19 Vector 购自宝生物工程(大连)有限公司;DNA 凝胶回收试剂盒购自爱思进生物技术(杭州)有限公司。

1.2 方法

1.2.1 引物设计及合成 参照绵羊的 *OPN* 基因(GenBank 登录号:NM_001009224.1)设计引物:F,5'-GGACTG-GACTCTTCTCTGCTGC-3';R,5'-CCACCCTGCTTTAA-CATATCCT-3',扩增片段全长 952 bp。引物序列送交上海英骏生物技术有限公司合成。

1.2.2 卵巢总 RNA 的提取、cDNA 的合成 提取川中黑山羊卵巢总 RNA,采用 Fermentas 反转录试剂盒进行 cDNA 合成。

1.2.3 *OPN* 基因的 PCR 扩增 以反转录 cDNA 为模板进行 PCR 反应,反应体系为 25 μL:2 × *Taq* PCR MasterMix 12.5 μL,上、下游引物(20 pmol/L)各 1 μL,cDNA 模板 0.5 μL,ddH₂O 10 μL。PCR 反应条件:95 ℃ 预变性 3 min;94 ℃ 变性 30 s,60 ℃ 退火 40 s,72 ℃ 延伸 90 s,35 个循环;72 ℃ 延伸 5 min。4 ℃ 保存。

1.2.4 克隆及重组子筛选和鉴定 PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后,按照 DNA 凝胶回收试剂盒说明书进行胶回收,回收产物与 pMD-19 Vector 16 ℃ 连接过夜。连接反应产物转化宿主菌大肠杆菌 DH5α 感受态细胞,涂布于含氨苄青霉素、X-Gal、IPTG 的 LB 固体平板上,37 ℃ 培养过夜。挑选白色单克隆菌落于 LB 液体培养基 37 ℃ 振荡培养 12 h,取菌液作 PCR 鉴定,产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后,挑选阳性克隆菌液 2 mL 送交上海英骏生物技术有限公司测序。

1.2.5 生物信息学分析 利用软件 DNAMAN 将扩增获得的川中黑山羊 *OPN* 基因序列与 GenBank 中检索到的绵羊(NM_001009224.1)、牛(AF_492837.1)、猪(AK_234564.1)、人(DQ_846871.1)、小鼠(AF_515708.1)、鸡(M_59182.1)的相应区域进行核苷酸、氨基酸序列多重比对,构建物种分子进化树。用 ProtParam 程序(<http://web.expasy.org/protparam/>)分析蛋白的一级结构及其理化参数;用 ProtScale 程序(<http://expasy.org/tools/protscale.html>)进行疏水性分析;用 TM-HMM Server V. 2.0(<http://genome.cbs.dtu.dk/services/TM-HMM-2.0/>)进行跨膜区预测;用 SignalP 4.0 Server(<http://genome.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)预测信号肽;用

收稿日期:2013-09-24

基金项目:四川省应用基础项目(编号:2013JY0043)。

作者简介:胡 亮(1989—),女,重庆人,硕士研究生,从事动物遗传育种与繁殖研究。E-mail:huliang5210@163.com。

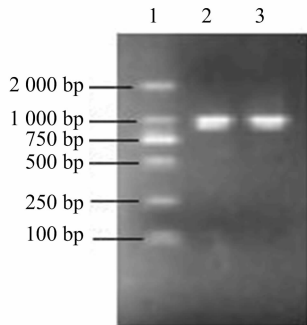
通信作者:字向东,硕士,教授,主要从事动物胚胎工程研究。E-mail:zixd@sina.com。

PSORT(<http://psort.hgc.jp/form.html>) 进行亚细胞定位预测;用 NetPhos 2.0(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) 预测磷酸化位点;用 NetOGlyc(<http://www.cbs.dtu.dk/services/>) 预测糖基化位点;用 GOR(http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_gor4.html) 预测蛋白质二级结构。

2 结果与分析

2.1 *OPN* 基因 PCR 扩增结果

吸取 4 μ L *OPN* 基因扩增产物,对其进行电泳检测。用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测条带,结果如图 1 所示,其中第 1 个泳道为 DL2000 DNA Marker,第 2、第 3 泳道为 *OPN* 基因目的条带,与预期大小 950 bp 基本一致,且目的条带明亮,有利于后续试验的进行。



1—DL 2000 DNA marker; 2、3—*OPN* 基因目的条带

图1 *OPN* 基因PCR产物电泳检测

2.2 川中黑山羊 *OPN* 基因的核苷酸序列分析

利用 DNAMAN 对测序结果进行拼接得到 952 bp 片段,与预期相符。用 ORF 查找器(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) 查找 *OPN* 的开放性阅读框并翻译出氨基酸序列,结果表明,*OPN* 基因起始密码子为 ATG(编码蛋氨酸),终止密码子为 TGA(不编码氨基酸),编码 278 个氨基酸。在 GenBank 上发表该序列,登录号为 KF699859。利用 DNAMAN 分析川中黑山羊与其他物种 *OPN* 基因 CDS 区的核苷酸序列同源性,结果显示,川中黑山羊与绵羊、牛、猪、人、小鼠、鸡的同源性分别为 98%、95%、79%、79%、70%、47%,说明 *OPN* 基因进化相对保守。同时用 Clustal X、MEGA4.0 等软件对川中黑山羊、牛、马、猪、人、黑猩猩、大鼠、小鼠的核苷酸序列采用邻接法(NJ)及最大简约法(MP)分别构建物种间分子系统进化树(图 2、图 3),结果表明,2 种方法构建的物种间分子系统进化树结果基本一致,且川中黑山羊与绵羊的关系最近,符合进化关系。

2.3 川中黑山羊 *OPN* 蛋白的结构特征分析

生物信息学分析结果表明,川中黑山羊 *OPN* 蛋白的分子式为 $C_{1310}H_{2051}N_{371}O_{496}S_4$,相对分子质量为 311 062.1,理论等电点(PI)为 4.49,半衰期为 30 h,脂肪系数为 53.35,不稳定参数为 64.57,属于不稳定蛋白。*OPN* 蛋白为亲水性蛋白,信号肽长度为 16 个氨基酸残基,切入位点在丙氨酸与亮氨酸之间,属于分泌型蛋白。*OPN* 成熟肽没有跨膜区,成熟蛋白位于细胞外的概率是 0.820。*OPN* 多肽有 46 个磷酸化位点,分别为 Ser(39)、Thr(7)、Tyr(0)。*OPN* 多肽有 1 个 *N*-糖基化

位点(101 位)、2 个 *O*-糖基化位点(49 位、81 位)。*OPN* 蛋白 α 螺旋(73 个氨基酸残基)、延伸链(30 个氨基酸残基)、无规卷曲(175 个氨基酸残基)分别占靶蛋白的 26.2%、10.8%、63.0%。

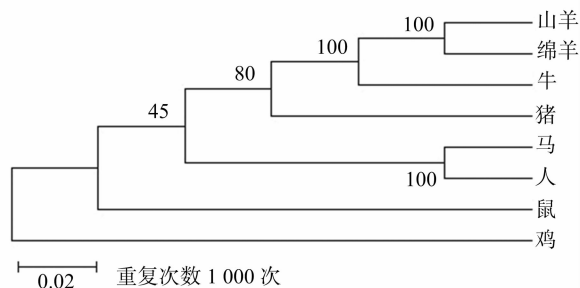


图2 采用邻接法构建的分子系统进化树

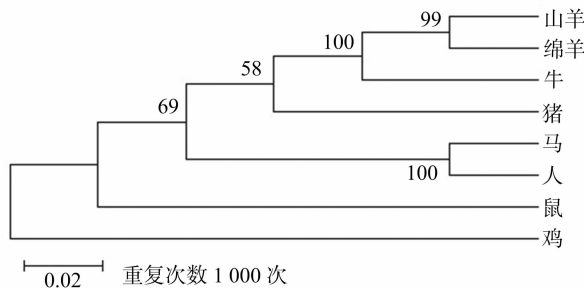


图3 采用最大简约法构建的分子系统进化树

3 结论与讨论

在分子水平上,*OPN* 几乎参加了生殖全过程,包括受精、胚泡着床及胎盘形成等^[8]。*OPN* 基因第 6 内含子存在由 305 bp 片段缺失而造成的多态,Lin 等证实了此多态性与母畜窝产仔数等繁殖性能显著相关^[9]。本试验通过 PCR 技术从川中黑山羊卵巢组织中克隆得到了 952 bp *OPN* 基因 cDNA 序列,起始密码子为 ATG,终止密码子为 TGA,符合大多数真核生物起始密码子具有的结构特征。经同源性比对可知,川中黑山羊与绵羊、牛 *OPN* 基因的 CDS 序列一致性分别达到 98%、95%。从 *OPN* 基因编码区分子系统进化树可以看出,川中黑山羊与绵羊聚为一支,与其他哺乳动物的遗传距离相对较小,与鸡的遗传距离最远,符合物种的遗传进化规律。本试验克隆测序获得了 *OPN* 基因的编码区全长 cDNA 序列,并运用生物信息学相关软件对该基因及编码蛋白进行序列与蛋白分析,预测了 *OPN* 基因所编码蛋白结构的位置,为日后开展山羊繁殖性状研究以及进一步研究 *OPN* 基因的表达、转录调控奠定了理论基础。

参考文献:

- [1] 吴井生,朱孟玲,陈超,等. 影响猪繁殖性能的候选基因 *OPN* 的研究进展[J]. 四川畜牧兽医,2007(2):31-32.
- [2] Kim S, Shin T. Immunohistochemical study of osteopontin in boar testis[J]. J Vet Sci, 2007, 8(2):107-110.
- [3] Fernandez M S, Escobar C, Lavelin I, et al. Localized osteopontin in oviduct tissue and eggshell during different stages of the avian egg laying cycle[J]. J Structural Biol, 2003, 143(3):171-180.

朱小翌, 张 林, 骆美蓉, 等. 牦牛胃蛋白酶原 C 基因的克隆及序列分析[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(5): 36–38.

牦牛胃蛋白酶原 C 基因的克隆及序列分析

朱小翌^{1,2}, 张 林^{1,2}, 骆美蓉^{2,3}, 江伟华^{1,2}, 林忠荔^{1,2}, 刘益丽^{1,2}, 江明锋^{1,2}

(1. 动物遗传育种学国家民委-教育部共建重点实验室 四川成都 610041; 2. 西南民族大学青藏高原研究院, 四川成都 610041;

3. 青藏高原动物遗传资源保护与利用四川省重点实验室, 四川成都 610041))

摘要:采用 RT-PCR 技术, 成功获得了牦牛胃蛋白酶原 C 基因, 用 ProtParam 在线工具对牦牛胃 PGC 蛋白的基本性质进行测定。结果表明, 其相对分子质量为 42 931.6, pI 值为 4.45, 半衰期为 30 h, 不稳定系数为 40.76, 总平均亲水性为 0.041。对该蛋白的二级、三级结构分析表明, 牦牛胃蛋白酶结构与黄牛没有明显区别, 均含有 5 个 α -螺旋、25 个 β -折叠, 三维结构也基本一致。

关键词:牦牛; PGC 基因; 克隆; 序列分析

中图分类号: TS201.2⁺5; Q785

文献标志码: A

文章编号: 1002-1302(2014)05-0036-03

酸性蛋白酶是胃蛋白酶、凝乳酶、微生物蛋白酶等的统称。目前, 酸性蛋白酶被广泛应用于食品工业、饲料添加剂、酿造、皮革制造、医药等行业^[1-5]。国际上研究最多的是胃蛋白酶。庞美蓉等研究发现, 胃蛋白酶能有效断裂大豆蛋白质中的肽键, 提高溶解度并且消化抗营养因子, 提升了大豆的营养价值^[6]。目前, 国内对胃蛋白酶的研究主要集中在采用亚硝基胍、紫外线、辐射等方法进行微生物源产酶菌株的选育。通过大肠杆菌、酵母及曲霉表达的重组凝乳酶已经上市, 并取得了较好的经济效益^[7]。目前, 学者们主要从猪、牛、羊等动物黏膜中提取胃蛋白酶遗传资源。本研究分析了克隆得到的麦洼牦牛胃蛋白酶原 C 基因 (PGC) 的结构, 旨在为研究青藏高原特有动物牦牛的基因资源并拓宽工程胃蛋白酶来源提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 材料与试剂 牦牛复胃组织样品采自四川省阿坝藏

族羌族自治州红原县; ex Taq 酶、pGEM-T Easy 载体试剂盒、T4 连接酶均购于天根生化科技有限公司; cDNA 合成试剂盒为 Thermo 产品。

1.1.2 引物的设计与合成 根据 GenBank 收录的黄牛 PGC、GAPDH 基因序列设计 2 对引物, 序列为 PGC-F: 5'-ATGAAGTGGATGGTACTGGCCTT-3'; PGC-R: 5'-AATAAACAGCTCTTCTCCACGTTGG-3'; PGC-qPCR-F: 5'-TGAGGACCTACAAGCACGA-3'; PGC-qPCR-R: 5'-ATAGCCTAAGATGCCAGTGA-3'; YAK-GAPDH-F: 5'-GACAAGATGGTGAAGGTCGGA-3'; YAK-GAPDH-R: 5'-TTACTCCTTGAGGCCATGTG-3'。引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 牦牛复胃组织总 RNA 的提取 按照试剂盒说明书用 TRIzol 法提取牦牛复胃总 RNA, 测量其 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 值, -80 °C 密封保存备用。

1.2.2 cDNA 的合成、扩增和回收目的基因 以牦牛复胃总 RNA 为模板, 使用 Thermo 反转录试剂盒, 合成牦牛复胃 cDNA。以上述反转录 cDNA 为模板, PGC-F、PGC-R 为引物, 扩增 PGC 基因。PCR 反应条件为: 95 °C 1 min; 95 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 30 s, 30 个循环; 72 °C 5 min。PCR 反应体系: cDNA 模板 1.5 μL , Primer F (10 $\mu\text{mol/L}$) 1 μL , Primer R (10 $\mu\text{mol/L}$) 1 μL , EX Taq DNA 聚合酶 0.2 μL , dNTP 混合物 1 μL , Mg^{2+} 2 μL , 加 ddH₂O 至 20 μL 体系。PCR 产物经 1% Agarose 电泳检测后, 用 DNA 凝胶回收试剂盒回收 PCR 片段, 并用 0.7% Agarose 电泳检测胶回收片段。

收稿日期: 2013-11-08

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 31172198); 教育部科学技术研究重点项目 (编号: 2102654); 西南民族大学中央高校基本科研业务费专项 (编号: 2014NZYQN59); 留学归国人员项目; 西南民族大学 2013 年研究生创新型科研项目 (编号: CX2013SZ64)。

作者简介: 朱小翌 (1989—), 男, 湖北洪湖人, 硕士研究生, 从事遗传学研究。E-mail: 604417607@qq.com。

通信作者: 江明锋, 博士, 教授, 从事遗传学研究。E-mail: mingfengjiang@vip.sina.com。

[4] 王振金, 王建民, 王桂芝, 等. 崂山奶山羊骨桥蛋白基因 (OPN) 部分片段多态性及其与生产性状的关联分析[J]. 农业生物技术学报, 2012, 20(10): 1168–1177.

[5] 张淑君, 熊远著, 曾凡同, 等. 猪 8 号染色体产仔数微卫星标记的探讨[J]. 养猪, 2001(2): 31–33.

[6] 尚帮华, 杨 婷, 连林生, 等. 骨调素基因多态性及其与大河乌猪繁殖性状相关分析的研究[J]. 云南农业大学学报, 2007, 22(6): 843–846.

[7] 孙敬礼, 武 磊, 黄 涛, 等. OPN 和 BMP15 基因与大长杂交一

代母猪产仔数的关系[J]. 猪业科学, 2010(4): 90–92.

[8] Higashibata Y, Sakuma T, Kawahata H, et al. Identification of promoter regions involved in cell and developmental stage-specific osteopontin expression in bone, kidney, placenta, and mammary gland: an analysis of transgenic mice[J]. Journal of Bone and Mineral Research, 2004, 19(1): 78–88.

[9] Lin C, Tholen E, Jennen D, et al. Evidence for effects of testis and epididymis expressed genes on sperm quality and boar fertility traits[J]. Reprod Dom Anim, 2006, 41(6): 538–543.